

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450073

研究課題名(和文) 昆虫の培養細胞を用いた植物ウイルスの伝搬に関わるウイルス・宿主因子の解明

研究課題名(英文) Clarification of the factors that involve plant reoviral infection and multiplication in insect vector cell monolayer.

研究代表者

一木 珠樹 (Ichiki, Tamaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源センター・上級研究員

研究者番号：70355501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科植物ウイルスは吸汁性昆虫であるツマグロヨコバイに媒介され、イネに感染し、収量低下などを引き起こす。そこで、ウイルスがツマグロヨコバイの培養細胞に感染、増殖するために必要な因子を明らかにすることを試みた。その結果、Hsp70の阻害剤であるケルセチンを培養細胞に処理した際にはイネ萎縮ウイルスまたはrice gall dwarf virusの感染、増殖率が顕著に低下した。そこでHsp70をコードすると思われる宿主遺伝子の発現を阻害し、ウイルスを接種したところ、感染、増殖が低下した。この結果から、Hsp70遺伝子の発現がウイルスの昆虫細胞への感染増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rice dwarf virus and rice gall dwarf virus, which are members of the family Reoviridae are transmitted by insect vectors (*Nephotettix cincticeps*) and infect rice plants. To control these diseases, preventing disease cycle of insect-plant is important. To understand the factors that play important role of insect host and virus interactions, some protein inhibitors were treated to vector cell monolayer (VCM) derived *N. cincticeps*. After the treatment, RDV or RGDV were inoculated to VCM. The application of 50 μ M Quercetin resulted in a drastic inhibition of RDV and RGDV infection/multiplication. This result suggested Hsp70 of VCM have important functions for RDV and RGDV infection/multiplication. The RNAi experiments were performed using Hsp70/Hsc70 VCM genes from EST analysis. We found RNAi Hsp70 genes resulted that reduction of multiplication RDV in VCM. These results showed that the host factor, Hsp70 has important role for infection/multiplication of rice reoviruses in insect cells.

研究分野：植物病学

キーワード：イネ科植物ウイルス 昆虫培養細胞 細胞機能阻害剤 RNA干渉

1. 研究開始当初の背景

世界で 1,000 種類以上発生している植物病原ウイルスの大部分は、昆虫によって伝搬されるが、その際、ウイルスのゲノムにコードされる因子と媒介昆虫が持つ宿主因子の間で親和性の成立が必要となる。このようなウイルス・昆虫双方の因子の解明は、昆虫の側からのウイルスまん延予防措置を取る上で重要であるが、植物ウイルスを対象にしたこれら因子の分子レベルでの特定及びその機能解明はほとんど行われていない。その理由として、植物側の宿主因子の解析に用いられているタバコ BY-2 細胞のような、操作性が高く迅速で安定した解析結果が得られる培養細胞株の樹立・維持が媒介昆虫由来では困難である点、またそれを用いたウイルス感染系の確立が容易でない点が挙げられる。

レオウイルス科に属するイネ萎縮ウイルスおよび rice gall dwarf virus は、ツマグロヨコバイに媒介されイネに萎縮や白斑、ゴールを生じさせ、収量を低下させるウイルスである。申請者の研究グループは、世界に先駆けて、イネの害虫でウイルスの媒介昆虫でもあるツマグロヨコバイの培養細胞株の樹立に成功し、それを利用することで、イネ萎縮ウイルスが媒介昆虫の神経系を利用して虫体内を移行する、培養細胞への侵入時にクラスリンを介したエンドサイトーシスを利用する、宿主のアクチンを介して移行することなどを明らかにした。また、イネ萎縮ウイルスがもつゲノム遺伝子に対する RNA 干渉を誘起させることに成功し、それにより昆虫細胞内でウイルスの移行が抑制できることを世界で初めて明らかにした。

2. 研究の目的

昆虫媒介性の植物ウイルスの防除は、媒介昆虫の防除や抵抗性品種の利用などに限られるが、防除については農薬を利用することへの消費者からの抵抗感があり、またウイルス抵抗性品種や耐虫性品種の開発については選抜の難しさや虫耐性の崩壊など、困難な点も多い。そこで本研究では、媒介昆虫-植物ウイルス-宿主植物という伝染環のなかで、特に昆虫とウイルスの相互作用に着目し、本病害のまん延予防措置を講じるための基礎知見を得ることを目的として、イネ萎縮ウイルスとそれを媒介するツマグロヨコバイの培養細胞を主に用いて、媒介昆虫でのウイルスの感染・増殖・移行に関与する因子を同定し、それらの機能を明らかにする。そのため、細胞機能を阻害する薬剤処理によって細胞機能の一部を阻害した培養細胞でのウイルス等の動態を解析し、ウイルスの生活環境に関わる宿主因子とその役割を明らかにする。また、EST 解析で得た遺伝子情報を基に、RNA 干渉によって宿主遺伝子の発現を一時的に抑制できるかを確認し、抑制した培養細胞におけるウイルスなどの感染・増殖様式と細胞内動態を解析する。

3. 研究の方法

(1) 各種細胞機能阻害剤を処理した培養細胞におけるイネ科植物ウイルスの感染増殖
イネ萎縮ウイルス等が感染、増殖する際に必要な宿主因子を探索するため、下記の細胞機能阻害剤(作用部位)を DMSO で溶解し、所定の濃度で培地に添加した後、イネ萎縮ウイルスまたは rice gall dwarf virus を接種した。接種 48 時間後にウイルスに対する抗体を使用して蛍光顕微鏡で観察を行い、ウイルスの増殖を観察した。また、細胞機能阻害剤が培養細胞に及ぼす影響を確認するため、トリパンブルー液で培養細胞を染色し、顕微鏡観察を行った。

1. ノイラミニダーゼ; シアル酸の分解
2. ダイナソア; ダイナミンの阻害
3. ケルセチン; Hsp70 機能阻害
4. ピフィスリン μ ; Hsp40/Hsp70 機能阻害
5. 17-AAG; Hsp90 の機能阻害

(2) 培養細胞の宿主遺伝子に対する RNA 干渉効果の解析

細胞機能阻害剤処理で得られた結果を基に、EST 解析で得た宿主遺伝子を複数選択し、T7dsRNA 作成キットで二本鎖 RNA を作成した。作成した RNA は濃度を調整した後、リポフェクチン処理で培養細胞に 5 時間導入した。導入後、リポフェクチンを取り除き、通常の培地で培養した。その後培養細胞を回収して洗浄した後、直ちに凍結して totalRNA を抽出し、チューブリン遺伝子をレファレンスとして対象遺伝子に対する RNA 干渉効果を調べた。

(3) dsRNA 導入による宿主遺伝子の発現干渉とウイルス感染、増殖への影響

培養細胞の宿主遺伝子に対する RNA 干渉効果を解析した後、干渉効果が作用している培養細胞にウイルスを接種した。接種後、複数の時間を設定して培地を除き、培養細胞を回収し直ちに凍結した。凍結した培養細胞から totalRNA を抽出し、ウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子を検出する特異的プライマーを用いてリアルタイム RT-PCR を行い、RNA 干渉下におけるウイルスの増殖量を解析した。対照として GFP 遺伝子由来の dsRNA を導入し、ウイルスを接種した培養細胞を用いた。

4. 研究成果

(1) 各種細胞機能阻害剤処下でのウイルスの感染増殖

各種細胞機能阻害剤を処理し、イネ萎縮ウイルスの感染増殖を解析した結果、20mU の高濃度のノイラミニダーゼ処理下でも、ウイルスの感染増殖に変化はなかった。シアル酸は昆虫でもその存在が示唆されており、また本研究で用いているウイルスが属するレオウイルス科のウイルスには、細胞感染時にシアル酸を受容体として利用する種があることが知られている。このようなウイルスに対して

は、ノイラミニダーゼを処理することで細胞表面のシアル酸が遊離し、感染の阻害が起きることが知られているが、本実験の結果から、イネ科植物ウイルスは、細胞感染時の受容体としてシアル酸を利用しないことが示唆された。

ダイナソアとピフィスリン μ 処理の培養細胞では、ウイルスの感染増殖率は低下したものの、培養細胞の生存率にも影響が認められたため、ウイルスの感染試験は行わなかった。一方、ケルセチンを $50\mu\text{M}$ 処理した培養細胞を用いた感染試験では、細胞の生存率に影響がなかった一方で、ウイルスの感染増殖はほとんど観察されなかった。17-AAGを $10\mu\text{M}$ 処理した細胞については、ウイルスの感染増殖もケルセチンほどの低下が観察されなかった。細胞の生存率に影響は見られなかった。

培養細胞を用いたウイルス感染実験による研究では、ウイルス種により Hsp90 の存在が重要であるものや Hsp40 を利用するものなどが報告されている。今回得られた結果から、イネ科ウイルスの昆虫培養細胞における感染増殖には、特に Hsp70 の存在が重要であることが示唆された(図 1)。なお、rice gall dwarf virus でも同様の結果が得られた。

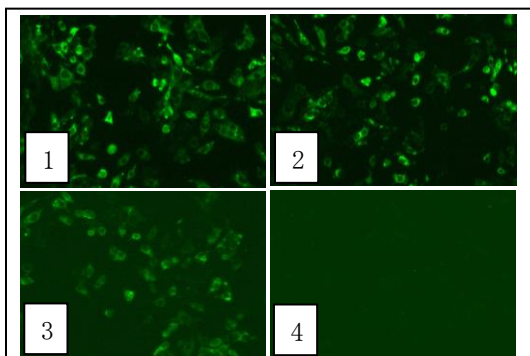


図 1. 細胞機能阻害剤処理によるウイルス感染増殖の影響

培養細胞に各種阻害剤を処理し、ウイルスを接種した。接種 48 時間後にウイルスに対する抗体を用いて FITC 標識を付け、蛍光顕微鏡で観察した。

1. 無処理 (DMSO 処理)
2. ノイラミニダーゼ (20mU)
3. 17-AAG ($10\mu\text{M}$)
4. ケルセチン ($50\mu\text{M}$)

(2) 培養細胞の宿主遺伝子に対する RNA 干渉効果の解析

細胞機能阻害剤を用いた実験により、Hsp70 がウイルスの感染増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、宿主遺伝子への干渉効果を調査した。

遺伝子は昆虫の遺伝子検索でキネシンに関連性が高い遺伝子を選び、dsRNA を作成した。プロトコールに従い、リポフェクチン処理にて培養細胞に dsRNA を導入した。導入後、遺伝子の内側に検出用プライマーを作成し、リ

アルタイム RT-PCR でキネシンと予測される遺伝子の発現を経時的に解析したところ、その発現抑制は1日後から3日後、最長6日後まで観察され、効果が長期間継続することが明らかになった(図 2)。

培養細胞では、dsRNA 導入による宿主遺伝子に対する干渉効果が低いものがあることが知られているが、この結果から、ツマグロヨコバイの培養細胞では dsRNA 導入により、宿主遺伝子の発現が干渉されることを確認できた。

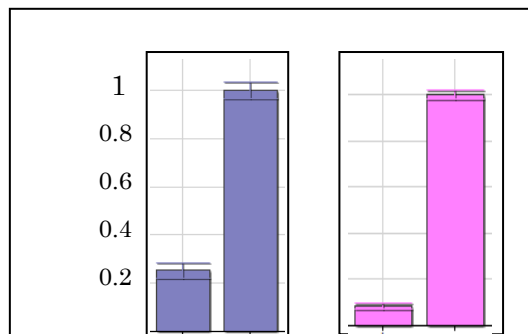


図 2. dsRNA 導入後の遺伝子の発現量の相対値

培養細胞にキネシン遺伝子由来の dsRNA を導入後、リアルタイム RT-PCR で遺伝子の発現量を比較した。レファレンス遺伝子はチューブリン遺伝子を使用し、三反復行った。対照は GFP 由来の dsRNA を用いた。左のカラム：

左からキネシン遺伝子由来 dsRNA 処理 1 日後のキネシン遺伝子の発現量、GFP 遺伝子由来の dsRNA 導入 1 日後のキネシン遺伝子の発現量

右のカラム：

左からキネシン遺伝子由来 dsRNA 処理 6 日後のキネシン遺伝子の発現量、GFP 遺伝子由来の dsRNA 導入 6 日後のキネシン遺伝子の発現量

(3) ウイルスの感染増殖に関わると予測された Hsp70 候補遺伝子を EST の結果から二種選び、その dsRNA をそれぞれ作成した後、培養細胞に導入し、ウイルスを接種した。24 時間及び 48 時間後に培養細胞を回収し、それぞれの Hsp70 候補遺伝子発現が干渉されていることを確認した後、ウイルスの特異的プライマーでリアルタイム RT-PCR を行い、ウイルスの増殖量を比較した。その結果、導入した候補遺伝子のうち、A 遺伝子は増殖量が対照と比較して $1/3$ 程度になったが、B 遺伝子は対照と比較してもほぼ変化がないか、むしろ増殖量が高くなる傾向が見られた。また Hsp70 を阻害するケルセチンを処理した場合、増殖量は遺伝子発現を抑制した区に比較して顕著に阻害された(図 3) 48 時間後の結果も同様の傾向がみられたが、レファレンス遺伝子であるチューブリンの発現量も低下しており、細胞にダメージが生じていることが

示唆されたため、ウイルスの感染増殖量の解析は接種後 24 時間程度が望ましいことが明らかになった。

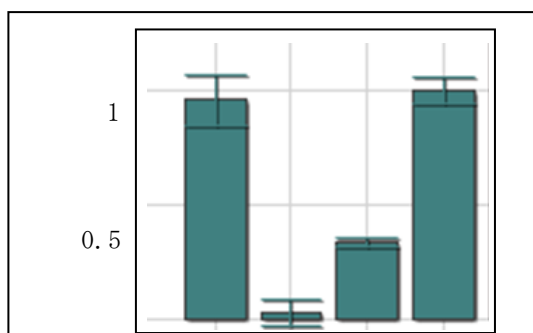


図 3 培養細胞におけるウイルスの相対的増殖量

ウイルスゲノム遺伝子の特異的プライマーを用いて相対的増殖量を計測した。実験は三反復行った。

左から：GFP 遺伝子導入後のウイルス増殖量、ケルセチン処理後のウイルス増殖量、遺伝子 A 導入後のウイルス増殖量、遺伝子 B 導入後のウイルス増殖量

A および B 遺伝子の塩基配列をサンガー法で決定し、BLAST 解析を行ったところ、A 遺伝子は GENBANK に登録されている Hsp70 遺伝子と高い相同性を示し、一方 B 遺伝子は Hsc70 遺伝子と高い相同性を示した。

Hsc70 は Hsp70 と相同性の高いタンパク質であり、生物において恒常的に発現していることが明らかとなっており、増殖に Hsc70 が重要な役割を果たしているウイルス種も存在する。しかし、本実験結果から、イネ科ウイルスの感染・増殖にはツマグロヨコバイの培養細胞の Hsp70 が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、また本培養細胞では、宿主遺伝子の発現干渉が対象遺伝子の dsRNA 導入により誘起され、かつその効果は継続することが明らかになった。遺伝子の発現干渉により誘起されたウイルスの感染増殖阻害効果は、Hsp70 の阻害効果を持つケルセチンよりも程度が低かった。通常 Hsp70 タンパク質は大きなファミリーとして複数種存在することが知られており、薬剤はその機能を広く阻害する効果を持つ。一方、RNA 干渉により発現抑制をした遺伝子は一種であったことから、その阻害効果も阻害剤処理に比べて若干弱かったと考えられた。

宿主遺伝子に対しても RNA 干渉効果が見られたことから、他の遺伝子についても同様の手法で機能解析が可能であること、また宿主因子の発現を抑制することでウイルスの感染、増殖を抑制することができたことで、新たな抗ウイルス農薬などを開発するための基礎知見が得られたと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

① Netsu O, Hiraguri A, Uehara-Ichiki T, Komatsu K, Sasaya T. (2015.5) Functional comparison of RNA silencing suppressor between the p5 protein of rice grassy stunt virus and the p3 protein of rice stripe virus. *Virus Research* 30(203).10-19 (査読あり)10.1016/j.virusres.2015.03.010

② Uehara-Ichiki T, Shiba T, Matsukura K, Ueno T, Hirae M, Sasaya T, Detection and diagnosis of rice-infecting viruses. *Front. Microbiol.*, 査読有, 4, 2013, 1-7 (査読あり)10.3389/fmicb.2013.00289

③ Shimizu T, Ogami T, Hiraguri A, Nakazono-Nagaoka E, Uehara-Ichiki T, Nakajima M, Akutsu K, Omura T, Sasaya T. (2013.11) Strong Resistance Against Rice grassy stunt virus Is Induced in Transgenic Rice Plants Expressing Double-Stranded RNA of the Viral Genes for Nucleocapsid or movement Proteins as Targets for RNA Interference. *Phytopathology* 103(5):513-9 (査読あり) 10.1094/PHYTO-07-12-0165-R

〔学会発表〕(計 3 件)

① Nakamichi Yusuke, Higashiura Akifumi., Narita, Hirotaka, Ichiki-Uehara Tamaki, Hagiwara Kyoji, Omura Toshihiro, Nakagawa Atsushi(2015.12.5). The high-resolution V-ray-crystal structure of the capping enzyme from Rice dwarf virus. The 13th conference of the Asian Crystallographic Association. Science City, Kolkata, India

② 中道優介、東浦彰史、宮崎直幸、成田宏隆、清水巧、一木(植原)珠樹、大村敏博、中川敦史 (2015.12.1) イネ萎縮ウイルスの外殻構築機構の解明. 第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学学会大会合同大会(神戸市ポートアイランド、兵庫県神戸市)

③ 一木(植原)珠樹、大橋美保、上野敬規、宮崎直幸、中川敦史。(2014.11.10) 熱ショックタンパク質 (Hsp70) はファイトレオウイルスの媒介昆虫細胞内での増殖に関与する。第 62 回日本ウイルス学会学術集会(パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一木 珠樹 (ICHIKI, Tamaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源センター 微生物分類評価チーム・上級研究員

研究者番号：70355501